

Strukturbildende phenolische Verbindungen in Getreideballaststoffen am Beispiel löslicher und unlöslicher Roggenballaststoffe

Mirko Bunzel und Hans Steinhart, Hamburg, John Ralph, Madison (USA)

1. Einleitung

Ballaststoffe (BS) bestehen gemäß Bener kürzlich erneut überprüften Definition aus „eßbaren Pflanzenteilen oder analogen Kohlenhydraten, die gegenüber der Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden. BS beinhalten Polysaccharide, Oligosaccharide, Lignin und assoziierte Pflanzensubstanzen. BS unterstützen gesundheitsfördernde Prozesse wie die Senkung des Cholesterinspiegels und/oder die Regulierung des Blutzuckerspiegels und/oder besitzen abführende Eigenschaften“ (1).

Neben den genannten physiologischen Eigenschaften der BS werden weitere positive Einflüsse auf die Gesundheit, u.a. Dickdarmkrebsprävention, diskutiert (2). Die Fermentation der BS durch die im Dickdarm ansässige Mikroorganismenflora u.a. zu kurzkettigen Fettsäuren soll bei der Dickdarmkrebsprävention von primärer Bedeutung sein. Die gebildeten kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat) haben einen direkten Einfluß auf die Kolonmukosa. Von größter Bedeutung scheint dabei Butyrat zu sein, das als wichtigstes luminales Substrat von der Mukosa oxidiert wird sowie bei Tumorzellen das Wachstum vermindert und Differenzierung und Apoptose induziert (2). Die Verstoffwechslung der Kohlenhydrate durch die im Dickdarm ansässigen Mikroorganismen kann des Weiteren zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Mikroorganismenflora führen, was Ausdruck in ihrer metabolischen Aktivität (u.a. reduzierte Bildung von genotoxischen und tumorfördernden Substanzen sowie von Karzinogenen) findet (3). Von entscheidender Bedeutung für den Fermentationsprozeß ist das Substratangebot. Die chemischen Strukturen sowie der Lignifizierungsgrad der Kohlenhydrate beeinflussen das Ausmaß der Fermentation. Auch das Verhältnis der gebildeten kurzkettigen Fettsäuren ist substratabhängig.

Des Weiteren können Karzinogene und andere schädliche Substanzen an die BS gebunden werden, und aus dem beschleunigten Kolontransit resultiert eine kürzere Kontaktzeit von Karzinogenen mit der Darmwand. Vor allem Lignin und andere hydrophobe Ballaststoffkomponenten sollen hydrophobe Wechselwirkungen mit möglichen Karzinogenen eingehen (4,5).

2. Polysaccharide als Ballaststoffkomponenten

GetreideBS bestehen überwiegend aus den unverdaulichen Bestandteilen der pflanzlichen Zellwand. Innerhalb der Zellwandpolysaccharide dominieren die Hemicellulosen, die bis zu 90% der Endospermzellwände darstellen. In den äußeren Schichten des Getreidekorns ist hingegen der Celluloseanteil erhöht.

Die Hemicellulosefraktion aus Endospermzellwänden setzt sich vor allem aus neutralen Arabinoxylanen und mixed-linked β -Glucanen zusammen. Neutrale Arabinoxylane bestehen aus linearen (1->4)-D-Xylan-Ketten, die in O-2-Stellung, O-3-Stellung oder in O-2 und O-3 Stellung mit L-Arabinose-Einheiten substituiert sind. Des Weiteren können in geringem Maße Arabinoseoligomere, die 1->2, 1->3 oder 1->5 verknüpft sind, Seitenketten bilden (6). Die Arabinoxylane der verschiedenen Getreide unterscheiden sich vor allem im Arabinose/Xylose-Verhältnis, im Arabinose-Substitutionsmuster sowie in der Molekülgröße. Mixed-linked β -Glucane bestehen aus (1->3) β -D- und (1->4) β -D-Glucoseeinheiten in einem Verhältnis von ungefähr 1:3. Hauptsächlich bilden die (1->4) β -D-Glucoseeinheiten Cellootriosyl- und Cellotetraosyleinheiten, die durch (1->3)-gebundene β -D-Glucoseeinheiten unter-

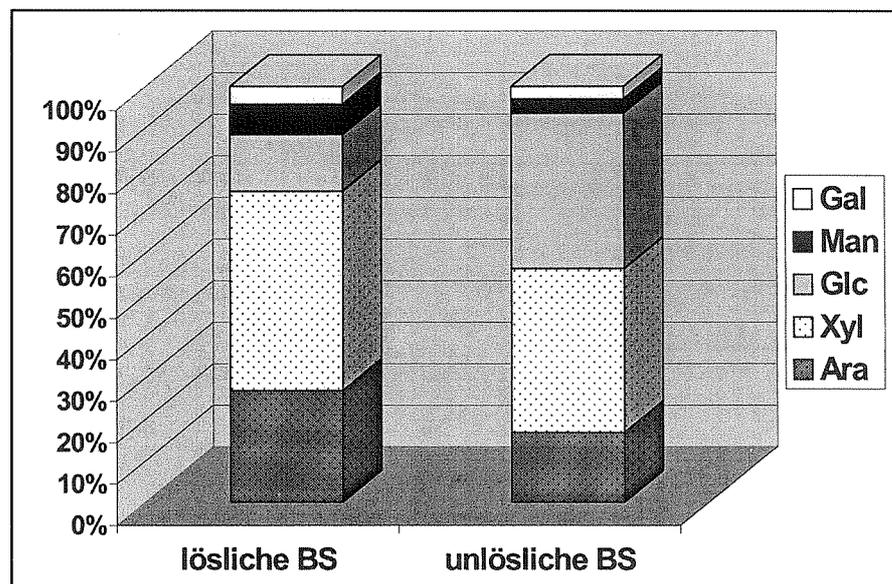


Abbildung 1: Anteile der Monosaccharide Galactose, Mannose, Glucose, Xylose und Arabinose in den Polysacchariden aus löslichen (links) und unlöslichen (rechts) Roggenballaststoffen. Rhamnose und Fucose wurden nur in Spuren detektiert.

brochen werden. Typische Getreide mit einem sehr hohen mixed-linked β -Glucan-Gehalt sind Gerste und Hafer.

Die Zellwände der äußeren Schichten des Getreidekorns unterscheiden sich von den Endospermzellwänden. Anstelle der neutralen Arabinoxylane und mixed-linked β -Glucane stellen die sauren Glucuronoarabinoxylane den Hauptanteil der Hemicellulosen (7). Durch den höheren Anteil von Zellen mit Sekundärwand ist der Celluloseanteil höher. Arabinogalactane, Xyloglucane und Mannane spielen in GetreideBS i.a. nur eine untergeordnete Rolle.

2.1 Kohlenhydratzusammensetzung von Roggenballaststoffen

Die Monomerenzusammensetzung der Kohlenhydrate der löslichen und unlöslichen RoggenBS spiegelt die zuvor genannten Verhältnisse für GetreideBS wider. Die Bestimmung der Monomeren erfolgte in Form ihrer Alditolacetate mittels GLC-FID nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung (8,9). Sowohl in den löslichen (LBS) als auch in den unlöslichen Ballaststoffen (UBS) dominieren die Bausteine der Arabinoxylane, die Arabinose und die Xylose (Abb. 1). Die Gluco-

seinheiten in den UBS stammen wohl überwiegend aus Cellulose, die in den LBS aus mixed-linked- β -Glucanen. Während Mannose und Galactose in geringen Anteilen vorliegen, wurden nur Spuren an Rhamnose und Fucose detektiert. Die ermittelten Arabinose/Xylose Verhältnisse der Arabinoxylane sind mit 0,56 (LBS) bzw. 0,43 (UBS) unauffällig und entsprechen den für GetreideBS erwarteten Verhältnissen.

3. Monomere Phenolcarbonsäuren als Minorkomponenten in Getreideballaststoffen

Phenolcarbonsäuren (PCS) wie Ferulasäure (FS), p-Cumarsäure (pCS) und Sinapinsäure (SA) sind Produkte des allgemeinen Phenylpropan-Stoffwechsels der Pflanzen. Schon seit den siebziger Jahren ist bekannt, daß gebundene Ferulasäure in signifikanten Mengen in der pflanzlichen Zellwand vorhanden ist. Erste Untersuchungen diesbezüglich wurden bereits 1976 an Zellwänden von Gramineen und Chenopodiaceen mittels UV-Fluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt (10).

3.1 Monomere Phenolcarbonsäuren in Roggenballaststoffen

Zur Untersuchung von estergebundenen PCS in LBS und UBS aus Roggen wurden diese unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert, die PCS mit Ether extrahiert, silyliert und mittels GLC-FID bestimmt. Dominierende alkalixtrahierbare PCS in LBS und UBS aus Roggen ist FS ($6949 \pm 506 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS bzw. $1504 \pm 177 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS (n=3)). Die Gehalte an pCS ($366 \pm 74 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS bzw. $17 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS (n=3)) und SA ($89 \pm 22 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS bzw. $16 \pm 4 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS (n=3)) liegen deutlich unter den FS-Gehalten (alle Angaben beziehen sich auf Asche- und Restprotein-korrigierte BS). Dies entspricht den Erwartungen, da in Gräsern größere Mengen an FS vor allem in den Getreidekleien zu finden sind, wohingegen pCS die dominierende PCS in Getreidehalmen und -stengeln darstellt (11). OHASHI und Mitarbeiter (12) konnten in Mais- und Gerstenkeimlingen geringe Mengen alkalilabiler SA identifizieren. Signifikante Mengen an SA wurden bisher jedoch nur in Zellwänden von Reis, sowie in den BS aus Wildreis gefunden (13).

4. Untersuchungen zur Bindung der Ferulasäure an Biopolymere

Zur Bestimmung, an welche Biopolymere und über welche Bindungsarten FS an Zellwandpolysaccharide gebunden ist, wurden wasserlösliche FS-Oligosaccharide isoliert und identifiziert. Zur Gewinnung von FS-Oligosacchariden aus

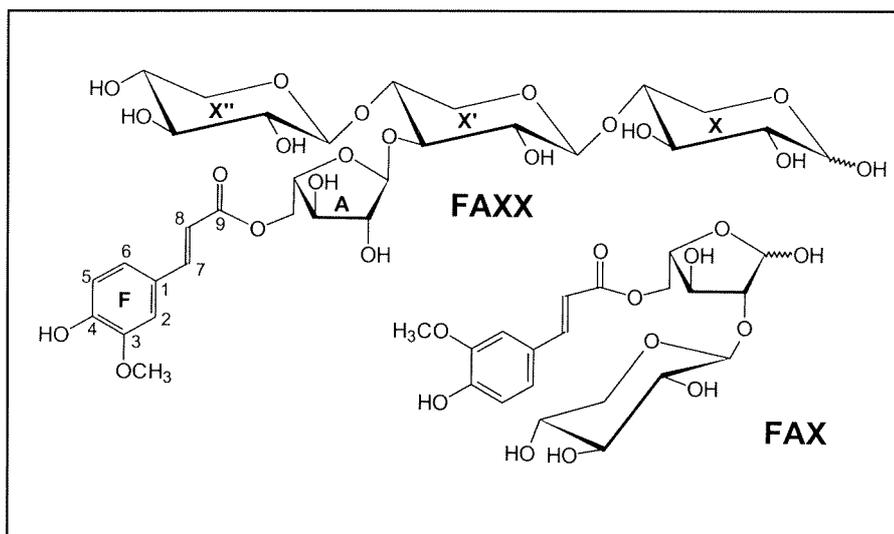


Abbildung 2: Aus Roggenballaststoffen isolierte Ferulasäure-Oligosaccharide; F – Ferulasäure, A – Arabinose, X, X', X'' – Xylose

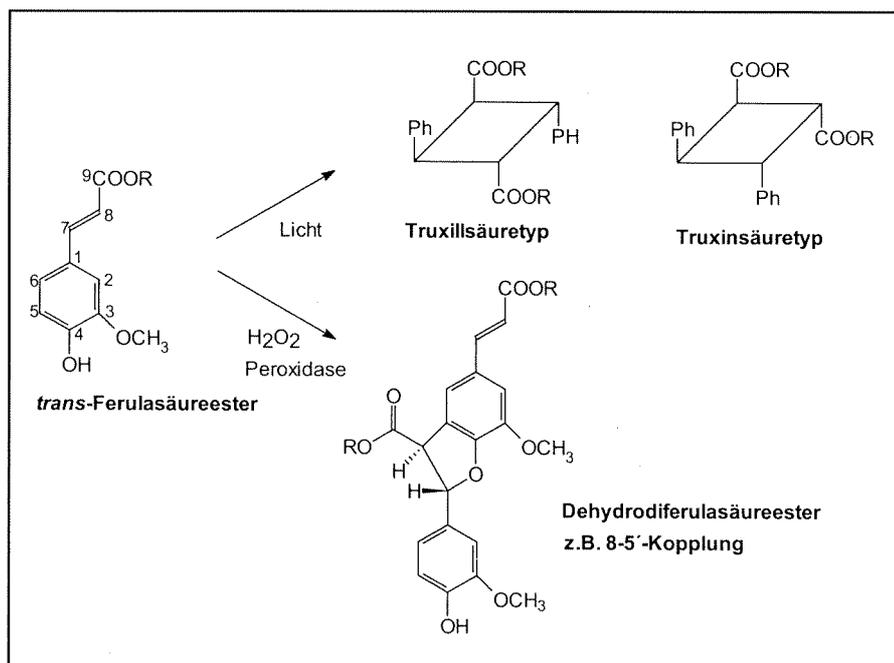


Abbildung 3: Photochemische und radikalische Dimerisierung von Ferulasäureestern

den BS sind Hydrolysemethoden notwendig, die die glykosidischen Bindungen teilweise hydrolysieren, die säure- und alkalilabilen phenolischen Substituenten jedoch nicht abspalten. Mit diesem methodischen Ansatz wurde bisher überwiegend Zellwandmaterial von Futtergräsern untersucht. Für die menschliche Ernährung bestimmtes Material wurde in weit geringerem Umfang in die Untersuchungen einbezogen. Unter den Getreiden wurden bisher nur Mais- und Weizenkleie bzw. -karyopsen detailliert analysiert (14).

4.1 Isolierung von Ferulasäure-Oligosacchariden

Zur Isolierung der FS-Oligosaccharide aus unlöslichen RoggenBS sind folgende Arbeitsschritte notwendig:

- Isolierung unlöslicher RoggenBS (präparatives, enzymatisches Verfahren),
- enzymatische Hydrolyse der BS mittels Driselase (Gemisch von Carbohydrasen ohne Esteraseaktivität) bzw. saure Hydrolyse (50 mM Trifluoressigsäure) der BS unter Erhalt möglicher Ester- und Etherbindungen,
- Reinigung und Vorfraktionierung der Hydrolysate (an Amberlite XAD-2),
- GPC-Fraktionierung (an Sephadex LH-20),
- (semi)präparative RP-HPLC-Fraktionierung/Reinigung der GPC-Fractionen.

4.2 Identifizierung von Ferulasäure-Oligosacchariden

Zur Identifizierung der isolierten FS-Oligosaccharide wurden folgende Verfahren angewendet:

- Identifizierung der PCS nach alkalischer Hydrolyse (HPLC-DAD),
- Identifizierung der Kohlenhydratkomponenten nach saurer Hydrolyse in Form ihrer Alditolacetate (GLC-FID),
- Massenspektroskopie (ESI-MS, MALDI-TOF-MS),
- Kernresonanzspektroskopie (1D und 2D-NMR, u.a. HMBC-Experiment).

Vor allem die Kombination der massenspektroskopischen Methoden mit den ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten ist zur Strukturaufklärung der FS-Oligosaccharide von großer Bedeutung (15). Von den NMR-Experimenten ist vor allem das Gradient-selected-HMBC-Experiment hervorzuheben, das zur Sequenzanalyse, zur Bestimmung der glykosidischen Bindungen und zur Bestimmung der Ringgröße der Kohlenhydratkomponenten angewendet werden kann.

Mit der vorgestellten Methodik wurden mehrere FS-Oligosaccharide isoliert und identifiziert. Zwei besonders aussagekräftige isolierte FS-Oligosaccharide sind in Abbildung 2 dargestellt. Die identifizierten FS-Oligosaccharide weisen

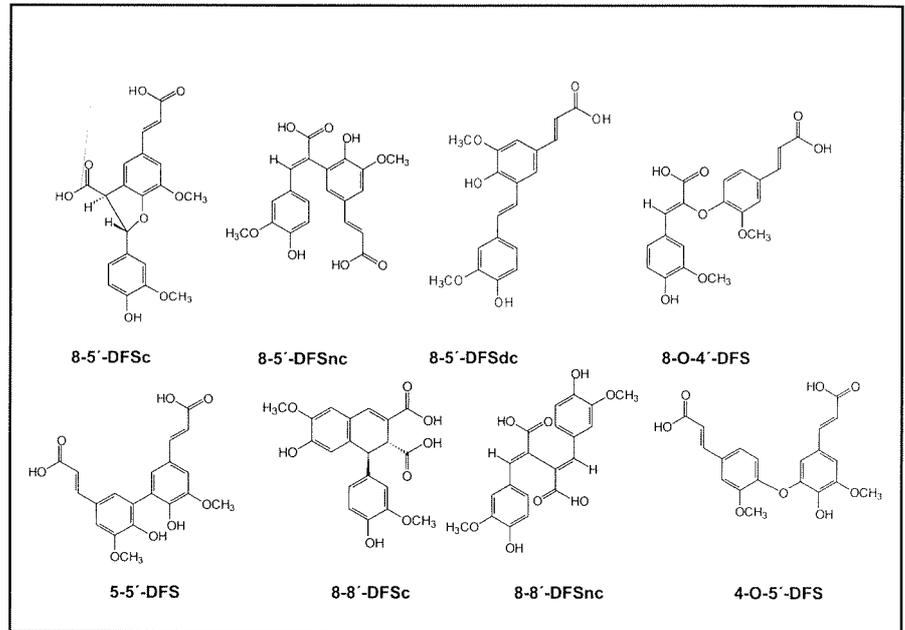


Abbildung 4: Strukturen von Dehydrodiferulasäuren (DFS); c – cyclic; nc – non-cyclic; dc – decarboxylated

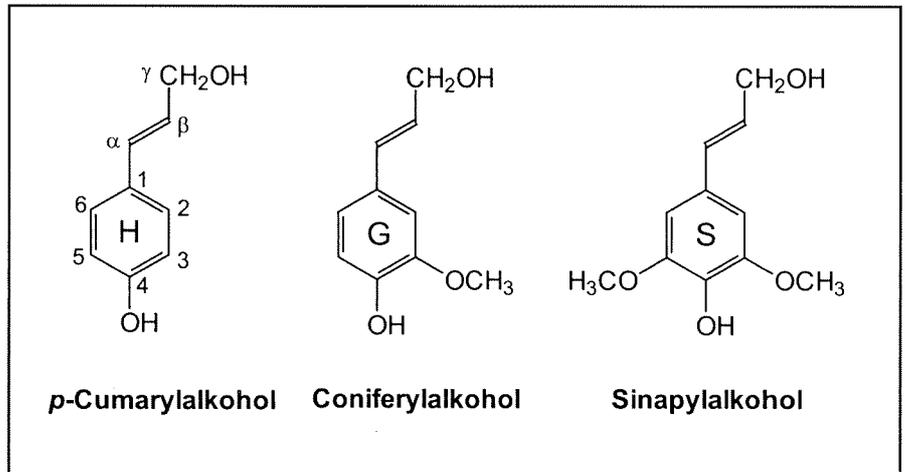


Abbildung 5: Monolignole

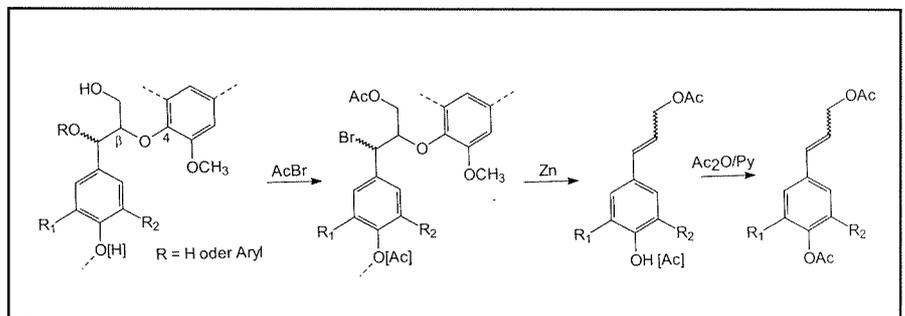


Abbildung 6: Selektive Etherspaltung durch Anwendung der DFRC-Methode: Lösen der Zellwände und Derivatisierung mittels Acetyl bromid in Essigsäure, reduktive Spaltung mittels Zink und anschließende Acetylierung

darauf hin, daß FS in RoggenBS scheinbar nur an Arabinoxylane gebunden vorliegt. Die Bindung der FS erfolgt über eine Esterbindung an die C5-Position der Arabinose. Andere Bindungsarten oder Positionen wurden nicht identifiziert. Des weiteren scheint Ferulasäure lediglich an solche Arabinoseeinheiten gebunden zu sein, die über eine (1->3)-Bindung mit der Xylanhauptkette assoziiert sind. Die Substitution des Ferulasäurearabinosids in C2-Position mit einer weiteren Xyloseeinheit (FAX, Abb. 2) tritt nur sehr selten auf, vergleicht man die RoggenBS z.B. mit denen von Mais (16) oder Wildreis (13).

5. Diferulasäuren als Crosslinks in Getreideballaststoffen

Durch die Bindung von FS an Arabinoxylane bieten sich mehrere Mechanismen, Arabinoxylanketten miteinander zu koppeln. Aufgrund der Bifunktionalität der FS (Carboxyl- und phenolische Hydroxylgruppe) besteht die Möglichkeit, zwei Arabinoxylanketten mit Hilfe monomerer FS über eine Ester- und eine Etherbindung zu verknüpfen. Bei den bisherigen Strukturuntersuchungen konnten jedoch keinerlei Hinweise auf eine Etherbindung zwischen FS und Polysacchariden gefunden werden, so daß zwei andere Mechanismen wahrscheinlicher sind (Abb. 3): a) Kopplung über photochemisch gebildete Dimere der FS, b) Kopplung über radikalisch gebildete Dehydrodiferulasäuren (DFS) unter Nutzung zellwandgebundener Peroxidase und H_2O_2 .

5.1 Photochemische Kopplung: Bildung von Cyclobutanderivaten

Zimtsäure und einige Derivate sowie deren Ester können unter Einwirkung von UV-Licht im Zuge einer (2+2)-Cycloaddition zu Cyclobutanderivaten dimerisieren. Bei der Dimerisierung können Truxillsäure (2,4-Diphenyl-cyclobutan-1,3-dicarbonsäure)- oder Truxinsäure (3,4-Diphenyl-cyclobutan-1,2-dicarbonsäure)-Derivate entstehen. Packert (17) identifizierte pCS und FS Homo- und Heterodimere in den alkalischen Hydrolysaten aus UBS einiger Getreide, u.a. Roggen. Dieser Mechanismus scheint demnach auch für die Kopplung von Zellwandpolysacchariden möglich, spielt aber gegenüber der radikalischen Kopplung von FS-Estern nur eine untergeordnete Rolle.

5.2 Radikalische Kopplung: Bildung von Ferulasäuredehydrodimeren

FS-Ester können über ihre Phenoxyradikale (Bildung durch zellwandgebundene Peroxidase und H_2O_2) zu DFS-Estern dimerisieren. Die elektronen-delokali-

sierten Phenoxyradikale koppeln an ihren 4-O-, C5- oder C8-Positionen zu 8-5-, 8-O-4-, 5-5-, 8-8- und 4-O-5'-gebundenen DFS-Estern. Ausgehend von diesen mechanistischen Überlegungen synthetisierten RALPH und Mitarbeiter (18) sieben DFS und konnten diese mit Ausnahme der 4-O-5'-gebundenen DFS u.a. in alkalischen Hydrolysaten aus Zellwänden von Knäuelgras nachweisen. Mit der Identifizierung der 4-O-5'-gebundenen DFS in verschiedenen Getreiden gelang jedoch später auch der Nachweis der letzten nicht erfassten DFS (19).

5.3 Dehydrodiferulasäuren in Roggenballaststoffen

Zum Nachweis von DFS in Getreideballaststoffen wurden die DFS mittels alkalischer Hydrolyse aus ihren (Ester-)Bindungen freigesetzt. Durch flüssig-flüssig-Extraktion mit Ether wurden die DFS aus dem angesäuerten Hydrolyseansatz extrahiert und im Anschluß zur Erhöhung der Flüchtigkeit silyliert. Die Identifizierung der DFS erfolgte massenspektroskopisch (9) nach gaschromatographischer Trennung. Synthetisierte Standardsubstanzen wurden zur Absicherung der Ergebnisse eingesetzt. Die Quantifizierung der DFS erfolgte nach identischer Aufarbeitung mittels GLC-FID. Monomethylierte 5-5'-DFS wurde als interne Standardsubstanz verwendet.

In den UBS aus Roggen wurden die in Abbildung 4 dargestellten 8-5-, 8-O-4-, 5-5-, 8-8- und 4-O-5'-gebundenen DFS identifiziert, wohingegen in den LBS 4-O-5'-gebundene DFS nicht nachgewiesen wurde. Die Gehalte für die Summe der DFS in den Hydrolysaten der UBS und LBS aus Roggen wurden zu $3647 \pm 132 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS ($n=3$) bzw. $83 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS ($n=3$) bestimmt (9). Die Angaben beziehen sich auf Asche- und Restprotein-korrigierte BS. Ein strukturelles Merkmal für LBS und UBS ist neben dem Substitutionsgrad der Arabinoxylane mit FS und DFS (s.u.) der Dimerisierungsgrad der gebundenen FS. Zur Abschätzung, welcher Anteil der „Gesamtferulasäureverbindungen“ (= FS + DFS) in dimerisierter Form vorliegt, wurde ein einfacher Faktor $(\sum\text{DFS} [\text{mg g}^{-1}]/(\text{FS} [\text{mg g}^{-1}] + \sum\text{DFS} [\text{mg g}^{-1}])) \times 100$ gebildet. Dieser entspricht ungefähr dem prozentualen Anteil der dimeren FS an den Gesamtferulasäureverbindungen. Die Werte für die genaue molare Berechnung unterscheiden sich von dem vorgestellten Faktor kaum. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß sich der Faktor nur auf monomere und dimere FS bezieht, die ausschließlich in Esterbindungen vorliegen. FS, die z.B. über eine Etherbindung oder C-C-Bindung an Lignin gebunden sind, finden hier keine Berücksichtigung. Der vorgestellte Faktor beträgt für die UBS aus Roggen 34,4, für die LBS 5,2. Hieraus wird deutlich, daß in den UBS der Anteil der DFS an den

Gesamtferulasäureverbindungen höher ist (Faktor 6,6) als in den LBS.

Wie bereits gezeigt wurde, ist FS in RoggenBS wahrscheinlich ausschließlich an Arabinoxylane gebunden. Die absoluten Gehalte an monomeren und dimeren FS in den UBS bzw. LBS sagen weder etwas über den Substitutionsgrad der Arabinoxylane mit FS noch über den Verknüpfungsgrad der Arabinoxylane über DFS aus, da die Arabinoxylangehalte in den UBS und LBS (und auch in den BS aus anderen Getreiden) unterschiedlich sind. Eine Möglichkeit, die ermittelten FS/DFS-Gehalte auf den Arabinoxylangehalt zu beziehen, besteht darin, einen Faktor zu bilden, der die FS/DFS-Gehalte auf die ermittelten Xylosegehalte bezieht. Der molare Faktor $((\text{FS} [\text{mol g}^{-1}] + 2 \times \sum\text{DFS} [\text{mol g}^{-1}]) / \text{Xyl} [\text{mol g}^{-1}]) \times 1000$ stellt das Verhältnis der (hypothetischen) „Gesamtferulasäureverbindungen“ vor der Dimerisierung zum Arabinoxylangehalt dar. Die Werte für diesen Faktor betragen für RoggenUBS 34,9, für RoggenLBS 6,0. Dies deutet darauf hin, daß die Arabinoxylane der RoggenLBS weitaus geringer mit FS verestert sind als die der RoggenUBS. Die geringere Veresterung der Arabinoxylane der LBS mit FS („vor Dimerisierung“), verbunden mit einem ebenfalls niedrigeren Dimerisierungsgrad der FS in den LBS führt zu viel niedrigeren Verknüpfungsgraden der Arabinoxylane über DFS, ausgedrückt durch den molaren Faktor $(\sum\text{DFS} [\text{mol g}^{-1}] / \text{Xyl} [\text{mol g}^{-1}]) \times 1000$. Dieser Faktor beträgt für RoggenLBS ca. 0,2 und für RoggenUBS ca. 6,2 (9). Die Arabinoxylane der RoggenUBS sind somit ungefähr 39 mal (Rundungen sind zu beachten) stärker über DFS-Brücken miteinander verbunden als die der entsprechenden LBS. Die gleiche Tendenz wurde auch für die BS aus anderen Getreiden ermittelt (9). Dies kann einen wesentlichen Faktor für die Unlöslichkeit der Arabinoxylane als Bestandteile der UBS darstellen. Auch wenn allgemein angenommen wurde, daß die Löslichkeit der Arabinoxylane hauptsächlich von ihrem Arabinosesubstitutionsgrad abhängt, zeigen die erzielten Ergebnisse, daß die Löslichkeit auch stark im Zusammenhang mit dem Verknüpfungsgrad über DFS steht. Dies erscheint logisch, da durch die Verknüpfung von Arabinoxylanen durch nur wenige DFS-Brücken das Molekulargewicht der Arabinoxylane immens steigt.

Der Einfluß des Crosslinkings von Arabinoxylanen über DFS auf die Abbaubarkeit von Primärzellwänden aus Maiszellsuspensionen durch Enzymmischungen aus Pilzkulturen wurde kürzlich untersucht (20). Es wurde gezeigt, daß durch Erhöhung des Dimerisierungsgrades und der damit verbundenen Erhöhung des Vernetzungsgrades sowohl Ausmaß als auch Geschwindigkeit des Polysaccharidabbaus herabgesetzt werden. Diese Ergebnisse sind interessant in Hinblick auf die Fermentierbarkeit der Arabinoxylane im menschlichen Dickdarm durch die

dort ansässige Mikroorganismenflora. Ng und Mitarbeiter (21) zeigten, daß bei der Behandlung einer Arabinoxylanlösung mit Peroxidase und H_2O_2 eine Gelbildung eintritt, die auf die Bildung von DFS-Crosslinks zurückzuführen ist. Die Viskosität der BS wird vor allem mit den physiologischen Effekten der Blutzuckerregulierung und der Senkung des Blutcholesterins in Verbindung gebracht.

6. Lignin als Bestandteil von Getreideballaststoffen?

Lignin ist definiert als „polymeres Naturprodukt, das durch enzymatisch initiierte Dehydrogenierungs-Polymerisation dreier primärer Vorstufen, Coniferyl-, Sinapyl- und p-Cumarylalkohol (Abb. 5), entsteht“ (22). Diese Vorstufen werden häufig nach ihrem aromatischen Kern auch als Guaiacyl (G)-, Syringyl (S)- und p-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten bezeichnet und sind Produkte des Phenylpropan-Stoffwechsels.

Peroxidasen und/oder Oxidasen reagieren mit diesen Vorstufen und dem sich entwickelnden Ligninmolekül zu Enelektronen-oxidierten, resonanzstabilisierten Produkten. Diese bilden durch komplexe Kopplungsreaktionen das Polymer. Während der Kopplungsreaktionen entstehen sowohl Ether- (Alkyl-O-Aryl, Aryl-O-Aryl) als auch C-C-Bindungen. Das Verhältnis der H-, G- und S-Einheiten im Polymer sowie viele Strukturkennzeichen hängen von der botanischen Herkunft, dem betrachteten Pflanzenteil und -gewebe sowie der Lokalisierung in der Pflanzenzellwand ab (23). Lignin in Gräsern wird zu dem H-G-S-Typ gerechnet, wobei die H-Einheiten normalerweise eine untergeordnete Rolle spielen.

In der Literatur werden Getreidekleien häufig als „stark lignifiziert“ beschrieben. Wie unter 1. beschrieben, werden die physiologischen Eigenschaften von Getreideballaststoffen auch häufig mit der Lignifizierung in Verbindung gebracht. Allerdings finden sich in der Literatur kaum Hinweise darauf, daß Getreidekaryopsen Lignin gemäß der Definition enthalten. Vielmehr erfolgt die Lignin-Bestimmung fast ausschließlich als „Klason-Lignin“ (acid-insoluble residue). Klason-Lignin enthält jedoch als säureunlöslichen Rückstand u.a. auch Strukturproteine und Wachse. Der Nachweis von Klason-Lignin sagt somit nichts darüber aus, ob die entsprechende Probe Lignin gemäß der Definition enthält.

Ein anderes Verfahren der Ligninbestimmung, die Bestimmung als „Acetylbromid lösliches Lignin“, beruht auf der Löslichkeit von Lignin und anderen Zellwandbestandteilen in einer Mischung aus Acetylbromid und Essigsäure. Auf Basis dieser Bestimmung wurde von Lu und Ralph (24-26) eine Methode zur Freisetzung von Ligninmonomeren aus

β -O-4-Bindungen entwickelt (DFRC (derivatization followed by reductive cleavage)-Methode). β -O-4-Bindungen (Abb. 6) stellen normalerweise den dominierenden Bindungstyp im Ligninmolekül dar. Berücksichtigt werden muß aber auch, daß der dominierende Bindungstyp vom Entwicklungsstadium des Lignins abhängig ist. Die DFRC-Methode beruht auf zwei Hauptschritten (Abb. 6): 1) Lösen des Lignins (und anderer Zellwandbestandteile) durch Bromierung und Acetylierung (Umsetzung von α -Hydroxylgruppen und α -(Aryl)Ethern zu α -Bromderivaten, schnelle Acetylierung von α -Hydroxylgruppen, langsame Acetylierung von phenolischen Hydroxylgruppen) 2) β -Brom-Ether oder -Ester können in polaren Lösungsmitteln mit Zinkstaub reaktiv gespalten werden. Nach Acetylierung der phenolischen Hydroxylgruppe werden die freigesetzten „acetylierten Monolignole“ mittels GLC-MS/GLC-FID identifiziert und quantifiziert.

Zum Nachweis von Ligninstrukturen in RoggenBS (Freisetzung von Ligninmonomeren, die über β -O-4-Bindungen in das Polymer eingebaut wurden) wurden sowohl unlösliche RoggenBS direkt zur DFRC-Methode eingesetzt als auch speziell vorbehandelte unlösliche RoggenBS. Die speziell vorbehandelten RoggenBS wurden einer alkalischen Hydrolyse und Etherextraktion unterzogen, um zu verhindern, daß dimere (evtl. auch oligomere) Kreuzprodukte (teilweise über β -O-4-Bindungen gekoppelte Verbindungen, bestehend aus Ferulasäure und Coniferylalkohol) „polymeres Lignin“ vortäuschen (27).

Mit Hilfe der DFRC-Methode wurden in Roggenballaststoffen eindeutig Ligninstrukturen nachgewiesen. „Ligninstrukturen“ bedeutet in diesem Fall polymere Strukturen, in die Ligninmonomere über β -O-4-Bindungen eingebunden worden sind. Sowohl in den nicht vorbehandelten als auch in den vorbehandelten RoggenBS wurden mit Hilfe der DFRC-Methode Ligninmonomere freigesetzt. Des weiteren wurden die Verhältnisse der freigesetzten Monomere bestimmt. p-Cumarylalkohol wurde nur in Spuren nachgewiesen und daher in der Verhältnisbildung nicht berücksichtigt. Das Verhältnis zwischen den dominierenden Coniferyl- und Sinapylalkohol beträgt ungefähr 2:1 (27).

Auch wenn in UBS aus Roggen (und aus anderen Getreiden) eindeutig Ligninstrukturen nachgewiesen wurden, so scheinen sich diese Ligninstrukturen doch von Ligninen anderer Herkunft (z.B. Weizen- oder Maisstroh) zu unterscheiden. Dies zeigt sich u.a. darin, daß aus GetreideBS deutlich weniger Ligninmonomere mit Hilfe der DFRC-Methode freigesetzt werden können als aus Ligninen z.B. aus Weizen- oder Maisstroh.

Über die bereits erwähnten Kreuzprodukte (teilweise über β -O-4-Bindungen gekoppelte Verbindungen, bestehend

aus Ferulasäure und Coniferylalkohol) können Polysaccharide an Lignin gekoppelt werden (27). Die Bindung der Polysaccharide an Lignin sollte deren physikochemische Eigenschaften erheblich beeinflussen.

7. Zusammenfassung

Die physiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen (BS) stehen im engen Zusammenhang mit der chemischen Struktur ihrer Komponenten. Phenolcarbonsäuren (PCS), z.B. Ferulasäure (FS), stellen nur Minorbestandteile in den BS dar, können jedoch aufgrund ihrer Eigenschaft, Crosslinks auszubilden, großen Einfluß auf die physikochemischen Eigenschaften der Ballaststoffkomponenten haben.

FS stellt sowohl in den unlöslichen (UBS) als auch in den löslichen Roggenballaststoffen (LBS) die dominierende alkaliextrahierbare PCS dar ($6949 \pm 506 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS bzw. $1504 \pm 177 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS (n=3)). In weitaus geringeren Mengen wurden auch Sinapinsäure und p-Cumarsäure nachgewiesen. Die Bindung der FS scheint ausschließlich an Arabinoxylane zu erfolgen. Hinweise auf die Assoziation zu anderen Polysacchariden liegen nicht vor.

In dem alkalischen Hydrolysat der unlöslichen RoggenBS wurde das gesamte Spektrum der Dehydrodiferulasäuren (DFS), das nach radikalischer Kopplung erwartet wurde, nachgewiesen (8-5', 8-O-4', 5-5', 8-8' und 4-O-5'-gebundene Strukturen). Auch die löslichen RoggenBS enthalten mit Ausnahme der 4-O-5'-gebundenen DFS das gesamte Spektrum an DFS. Die Gehalte für die Summe der DFS in den Hydrolysaten der UBS und LBS aus Roggen betragen $3647 \pm 132 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS (n=3) bzw. $83 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS (n=3). Unter Berücksichtigung der Ferulasäuregehalte ergibt sich daraus, daß FS in den UBS zu einem deutlich höheren Anteil in dimerisierter Form vorliegt als in den LBS.

Wird zusätzlich der Arabinoxylangehalt der LBS und UBS berücksichtigt, können folgende Aussagen getroffen werden:

- die Arabinoxylane der UBS aus Roggen sind häufiger mit FS substituiert als die der entsprechenden LBS,
- die Arabinoxylane der UBS aus Roggen sind ca. 39 mal häufiger über Diferulasäurebrücken miteinander verbunden als die der entsprechenden LBS.

Zur Überprüfung, ob RoggenBS Ligninstrukturen enthalten, wurde die DFRC-Methode auf UBS aus Roggen angewendet. Die DFRC-Methode ist eine Methode zur Strukturuntersuchung von Ligninen, mit der selektiv α - und β -Arylether gespalten werden. Mit Hilfe dieser Methodik wurden in RoggenBS eindeutig Ligninstrukturen (über β -O-4-Bindungen gebundene Ligninmonomere) nachge-

wiesen. Eine Kopplung von Polysacchariden an Lignin über PCS ist möglich.

Phenolische Verbindungen als Bestandteile von Getreideballaststoffen haben somit vielfältige Möglichkeiten, die physikochemischen Eigenschaften der Ballaststoffkomponenten, z.B. der Polysaccharide, und damit ihre physiologischen Eigenschaften zu beeinflussen.

Danksagung

Vielen Dank der Josef Schormüller-Gedächtnis-Stiftung sowie der H. Wilhelm Schaumann-Stiftung für die Gewährung eines Reiestipendiums. Dieses Forschungsvorhaben wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur

- Prosky, L.: When is dietary fiber considered a functional food? - *Biofactors* 2000, 12, S. 289-297.
- Plaami, S.P.: Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. - *Food Review International* 1997, 13, S. 29-76
- Rowland, I.: Non-digestible carbohydrates and gut function: implications for carcinogenesis. In: McCleary, B.V., und L. Prosky (Hrsg.): *Advanced dietary fibre technology*. - Oxford: Blackwell Science (2001) S. 226-231
- McDougall, G. J., I.M. Morrison, D. Stewart und J.R. Hillman: Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. - *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70 (1996) S. 133-150
- Ryden, P., und J.A. Robertson: The effect of fibre source and fermentation on the apparent binding properties of wheat bran preparations for the mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). - *Carcinogenesis* 16 (1995) S. 209-216
- Izydorczyk, M. S., und C.G. Biliaderis: Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. - *Carbohydrates Polymers* 28 (1995) S. 33-48
- Selvendran, R. R., und A.J. MacDougall: Cell-wall chemistry and architecture in relation to sources of dietary fibre. - *European Journal of Clinical Nutrition* 49 (1995) S. 27-41
- Theander, O., P. Aman, E. Westerlund und H. Graham: Enzymatic/chemical analysis of dietary fiber. - *Journal of the AOAC International* 77 (1994) S. 703-709
- Bunzel, M., J. Ralph, J.M. Marita, R.D. Hatfield und H. Steinhart: Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. - *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (2001) S. 653-660
- Harris, P. J., R.D. Hartley: Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. - *Nature* 1976, 259, S. 508-510
- Faulds, C. B., und G. Williamson: The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. - *Journal of the Science and Food of Agriculture* 79 (1999) S. 393-395
- Ohashi, H., E. Yamamoto, N.G. Lewis und G.H.N. Towers: 5-Hydroxyferulic acid in Zea mays and Hordeum vulgare cell walls. - *Phytochemistry* 1987, 26
- Bunzel, M., E. Allerdings, V. Sinwell, J. Ralph und H. Steinhart: Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. - *European Food Research and Technology* 214 (2002) S. 482-488
- Ishii, T.: Structure and functions of feruloylated polysaccharides. - *Plant Science* 1997, 127, S. 111-127.
- Bunzel, M.: Strukturaufklärung von Ballaststoffkohlenhydraten. - *Nachrichten aus der Chemie* 50 (2002) 3, S. 361-363
- Saulnier, L., J. Vigouroux und J.F. Thibault: Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. - *Carbohydrates Research* 272 (1995) S. 241-253.
- Packert, M.: Analytik und Bedeutung gebundener aromatischer Carbonsäuren der Nahrungsfaser aus Getreide und anderen Nutzpflanzen. - Hamburg, Univ., Diss. 1993
- Ralph, J., S. Quideau, J.H. Grabber und R.D. Hatfield: Identification and synthesis of new ferulic acid dehydromers present in grass cell-walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1994) S. 3485-3498
- Bunzel, M., J. Ralph, J. Marita und H. Steinhart: Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) S. 3166-3169.
- Grabber, J. H., R.D. Hatfield und J. Ralph: Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. - *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (1998) S.193-200
- Ng, A., R.N. Greenshields und K.W. Waldron: Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: Formation of ferulic acid dehydromers. - *Carbohydrates Research* 303 (1997) S. 459-462
- Sarkanen, K. V., und C.H. Ludwig: Lignins, occurrence, formation, structure and reactions. - New York: Wiley-Interscience (1971)
- Besle, J. M., A. Cornu und J.P. Jouany: Roles of structural phenylpropanoids in forage cell-wall digestion. - *Journal of the Science of Food and Agriculture* 64 (1994) S. 171-190
- Lu, F., und J. Ralph: Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997) S. 2590-2592
- Lu, F., und J. Ralph: The DFRC method for lignin analysis. Part 1. A new method for β -aryl ether cleavage: lignin model studies. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997) S. 4655-4660
- Lu, F., und J. Ralph: The DFRC method for lignin analysis. Part 2. Monomers from isolated lignins. - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) S. 547-552
- Bunzel, M., J. Ralph, H. Kim, R.D. Hatfield und H. Steinhart: Lignin structures in cereal grains. - *European Food Research and Technology* (in Vorbereitung)

Anschrift der Verfasser:

Dr. Mirko Bunzel und Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart,
 Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg,
 Grindelallee 117,
 D-20146 Hamburg.
 Bunzel@lc.chemie.uni-hamburg.de
 und
 Prof. Dr. John Ralph
 U.S. Dairy Forage Research Center, US-DA-Agricultural Research Service,
 Madison, WI 53706,
 USA.